

酸化ストレスで生成するニトロアルケンは生理的な 抗炎症剤か?

著者	小城 勝相
雑誌名	ビタミン
巻	87
号	7
ページ	367-373
発行年	2013-07-25
URL	http://id.nii.ac.jp/1146/00008154/

ミニレビュー

酸化ストレスで生成するニトロアルケンは生理的な抗炎症剤か？

Can nitroalkenes generated under oxidative stress be a physiological anti-inflammatory agent?

1. はじめに

炎症においては活性酸素、一酸化窒素、両者から派生する N_2O_3 , NO_2 , NO_2^- , ONOO^- など多くの化学種が発生する。これらは脂質、タンパク質、核酸塩基など多くの生体分子と反応し、生成物が酸化ストレス指標として使われてきたものもある。一方、これらの中で生理活性を示す分子もいくつか存在する。中でもニトロアルケン(ONO)は生体内で非酵素的に生成する抗炎症剤として注目に値するバイオファクターである。

2. 化学構造と生成機構

ニトリノール酸(LNO_2)の構造を図1に示す。この図には、9-ニトリノール酸を示したが、ニトロ基は10, 12あるいは13位に結合するものもあり、 LNO_2 はこれらの混合物である。これらの異性体はHPLCで分離可能で、合成した標品と比較しマススペクトルを駆使して構造が決定されている¹⁾。

ニトロオレイン酸(OA-NO_2)も同様で、9か10位にニトロ基が結合している。こちらも分離可能で、MS, NMRを駆使して構造決定されている²⁾。ここで重要なのは、二重結合にニトロ基が結合しているためマイケル付加の反応性が非常に高く、生体内の濃度でもタンパク質のCysにアルキル化が起こることで生理作用を発揮することである。

このようなニトロ不飽和脂肪酸の生成機構を予想すると、 NO_2 がNOと酸素による反応で、あるいはペルオキシダーゼなどによる NO_2^- の酸化により生成する。 NO_2 は不対電子を持つラジカルであり二重結合に付加すると炭素ラジカルが生成する。酸素濃度が低い生体

内では酸素が反応する前にもう一分子の NO_2 がこれに付加し、ジニトロ体から HNO_2 が脱離すればニトロ不飽和脂肪酸の構造になる³⁾。

3. 生体内濃度

ヒト血漿中の遊離 OA-NO_2 濃度は約600 nM、エステル化された OA-NO_2 濃度は300 nMであり、 OA-NO_2 濃度は LNO_2 濃度より50%程度高く、両方を合わせると1 μM 位の濃度になる²⁾。遊離とエステル化 LNO_2 の濃度はヒト血漿ではそれぞれ80および550 nMであり、赤血球ではそれぞれ50および250 nMであった⁴⁾。一方で、9- NO_2 -OA, 10- NO_2 -OAはともに約0.3 nMしかなく、 LNO_2 はさらに少なく、その濃度はFreemanの報告²⁾よりも1000倍低いというTsikasらの報告⁵⁾もある。両報告ともにマススペクトルを駆使する方法で行っており、現在の所どちらが正しいのかわからない。 OA-NO_2 がグルタチオン(GSH)やタンパク質に容易に付加することを考えると、血漿中のその濃度が600 nMあるのは高すぎると後にFreemanら⁶⁾も報告している。GSH濃度は血漿中では10 μM 程度であるが、臓器中ではmMオーダーになる。高反応性分子の定量は困難だが、その濃度はその生理作用を考える上で極めて重要であり、その定量法の解明が待たれる。

体内分布については、 OA-NO_2 をマウスに静注すると、それはすぐに血漿タンパク質とGSHに付加する。これらの付加体は β -メルカプトエタノール(ME)を加えるとMEの付加体になるので、マイケル付加は可逆的であることがわかった。 OA-NO_2 は肝臓で β -酸化され、16:1- NO_2 , 14:1- NO_2 , 12:1- NO_2 とそれに対応するCoA付加体になる。同時に OA-NO_2 は18:0- NO_2 と18:2- NO_2 にも変換される。 $[\text{H}]$ 18:1- NO_2 をマウスに静注すると、90分後には放射活性の64%が回収され、それらは血漿(0.2%)、肝臓(18%)、筋肉(31%)、尿(6%)、腎臓(2%)、脂肪組織(2%)などに分布してい

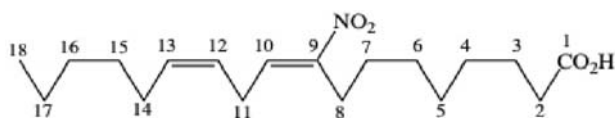


図1 ニトリノール酸の構造

た⁷⁾。マイケル付加が可逆的なら GSH などに付加したニトロアルケンが貯蔵され、適当な場所で遊離して機能する可能性もある。

4. 生理活性

10-および 12-ニトロリノール酸は pH 7.4 の緩衝液中で NO を放出しながら分解し、みかけの NO 放出速度定数は $9.67 \times 10^{-6} \text{sec}^{-1}$ である。一方、疎水性環境、例えばホスファチジルコリン / コレステロールリポソーム内では NO 放出は非常に遅いために LNO₂ は NO の膜貯蔵分子であると考えられる⁸⁾が、単に NO を放出するだけではあまり面白くない。それ以外の興味深い機能がニトロアルケンにはあり、そのことについて以下に述べる。

4-1. タンパク質との反応

脂質過酸化反応で生成する親電子物質がタンパク質を修飾する例として、HNE (4-ヒドロキシ-2-ノネナール) がインスリンの His⁹⁾、GADPH (グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ) の Cys、His および Lys¹⁰⁾、カテプシン B の Cys と His¹¹⁾などを修飾することが知られている。GADPH には活性中心に Cys149 が存在し、LNO₂ と OA-NO₂ はこの Cys に結合して GADPH 活性を阻害する。LNO₂ と OA-NO₂ の IC₅₀ は 3 μM 程度だが、それらの GADPH 活性阻害は peroxynitrite や過酸化水素より 30 倍も強力である。また、正常ヒト赤血球に GSH や GADPH の LNO₂ と OA-NO₂ の付加体が存在している¹²⁾。

HNE と比較して LNO₂ と OA-NO₂ の方が Cys への特異性は高いようである。その理由は GSH との反応速度をみると、LNO₂ と OA-NO₂ は pH 7.4、37°C でそれぞれ 355 および 183 $\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ であるが、過酸化水素は $2.6 \text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 、HNE は $1.3 \text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ であった。GSH との反応速度が LNO₂ と OA-NO₂ で高いのは、これらがチオールに対して圧倒的に高い反応性をもつためである¹³⁾。このことはニトロ基の重要性を示している。

OA-NO₂ は XOD (キサンチンオキシドレダクターゼ) を阻害し、その IC₅₀ は 0.6 μM であり、その阻害活性は痛風治療薬のアロプリノールより強い。OA-NO₂ は、非競争的阻害で XOD のモリブデン補因子の電子移動を阻害する。この阻害にはカルボン酸と二重結合に結合した NO₂ が必須である。アロプリノールは細胞に結合した XOD に対しては阻害活性が弱い、OA-NO₂ は強い阻害作用を示した¹⁴⁾。

4-2. 細胞系における作用

4-2-1. 血小板

ヒト血小板はトロンビンによって凝集、Ca²⁺濃度上昇、P-セレクチンの細胞表面への露出などが起るが、0.5 ~ 10 μM の LNO₂ を作用させるとこれらは用量依存的に阻害された。10 μM LNO₂ により血小板の VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein) の Ser157 がリン酸化された。このリン酸化は cAMP 依存性タンパク質キナーゼによるものであり、この作用はアデニル酸シクラーゼ阻害剤の添加で消失する。また、血小板ホモジネートにおける cAMP の AMP への加水分解も LNO₂ で阻害されることから、LNO₂ による血小板機能の阻害には cAMP が関与する¹⁵⁾。

4-2-2. 白血球

ヒト好中球を PMA (ホルボールエステル) か N-formyl-Met-Leu-Phe で活性化すると、O₂⁻発生、Ca²⁺流入、エラスターゼ放出、CD11b 発現などが起るが、LNO₂ は 0.25 μM でこれらを阻害した。これらの阻害は、LNO₂ がアデニル酸シクラーゼを活性化して cAMP 濃度を上昇させたことに起因しており、上記の血小板と類似の効果であった¹⁶⁾。

LNO₂ は、マウス RAW264.7 マクロファージに CD36 を発現させた。この発現は、PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ) 特異的阻害剤である GW9662 で阻害され、RXR α (retinoic X receptor α) 作動薬の 9-シス-レチノイン酸で増強された。以上のことから、LNO₂ は PPAR γ を活性化すること、またその活性化能力はロシグリタゾンと同程度であることがわかった¹⁷⁾。LNO₂ は PPAR γ の Cys285 にマイケル付加しており¹⁸⁾、LNO₂ と PPAR γ が結合した分子について X 線解析を用いてその構造が検討されている¹⁹⁾。

RAW264.7 マクロファージに LPS (lipopolysaccharide) を作用させると、IL-6 (インターロイキン-6)、TNF α (腫瘍壊死因子 α)、MCP-1 (monocytes chemoattractant protein 1) などが分泌されるが、LNO₂ と OA-NO₂ は 0.5 ~ 1 μM の濃度でこれらの分泌を有効に阻害した。この効果は NO、PPAR γ 、HO-1 (ヘムオキシゲナーゼ-1) などを介するものではなく、LNO₂ と OA-NO₂ が NF- κ B (nuclear factor κ B) の p65 にマイケル付加して DNA 結合能を阻害することで、NF- κ B の転写活性を阻害することによるものである²⁰⁾。

ニトロアルケンと同様にマイケル付加が可能な 15d-PGJ₂ (15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂) は RAW264.7 細胞において PPAR γ を活性化して NOS や TNF α の誘導を阻害するが、同時に NF- κ B の DNA 結合部位の Cys

に付加して転写活性を阻害することで抗炎症作用を示し、ニトロアルケンと類似の効果を有することが報告されている²¹⁾。

RAW264.7マクロファージにLPSを作用させると、炎症性STAT-1 (signal transducer and activator of transcription 1) 活性化とSTAT-1依存性のiNOS (誘導型NOシンターゼ) やMCP-1の転写活性が亢進するが、OA-NO₂とLNO₂はこれらを阻害した。これらの阻害効果はNOやPPAR γ によるものではなく、MKP-1 [MAPK (MAPキナーゼ) phosphatase 1] を誘導することで脱リン酸化が起き、炎症性STATシグナルが阻害される結果であった²²⁾。このように、マクロファージをLPSで活性化したときにも色々な経路が活性化されることがわかる。

4-2-3. 血管内皮細胞

LNO₂とOA-NO₂は、各2.5 μ MでLPSやTNF α で処理したTHP-1細胞(ヒト単球セルライン)やHUBEC(ヒト臍帯静脈内皮細胞)における接着分子VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) の発現を阻害した。また、LNO₂は10 μ MでTNF α によって活性化されたTHP-1細胞のヒト内皮細胞への接着やrollingを阻害した。これらの阻害は炎症反応を緩和することに寄与する²⁰⁾。また、HUBECにおいて、OA-NO₂はNrf2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2) 依存性のHO-1などの遺伝子発現を亢進するが、その亢進のメインはNrf2とは独立した経路である熱ショック転写因子の活性化によるものである。熱ショック応答は抗炎症性の反応であるために、ニトロアルケンがこのような作用により抗炎症作用を持つ可能性がある²³⁾。

HAEC(ヒト大動脈内皮細胞)に1 μ MのLNO₂を作用させると、その4時間後にHO-1 mRNAが8倍に、16時間後でそのタンパク量が2倍に増加した。ラット大動脈切片を25 μ M LNO₂で処理すると、HO-1タンパク質は40倍になり、その増加は内皮細胞と平滑筋に局在していた。このLNO₂の効果はPPAR γ 拮抗薬の影響を受けないのでPPAR γ に依存せず、NO捕捉剤としての働きに部分的に依存している²⁴⁾。その後、LNO₂によるHO-1の誘導はHO-1プロモーターのCREB (CRE-binding protein) -1がCRE (cAMP応答配列)とE-boxに結合することで起こること、またこの誘導にAP-1 (activating protein-1) も関与することが報告された²⁵⁾。

4-2-4. 大動脈平滑筋細胞

単層RSMC(ラット大動脈平滑筋細胞)やラット大動脈切片に10 μ MのLNO₂を作用させると、すぐに代

謝されNO₂⁻が10～20%生成した。これらの組織ではcGMPが増加し、張力の測定により内皮非依存的な弛緩が認められた。この弛緩作用はグアニル酸シクラーゼ阻害剤やNO捕捉剤で阻害されるので、LNO₂からNO類似分子が発生していることによると結論付けられている。すなわち、LNO₂はNOの貯蔵分子として機能している²⁶⁾。

LNO₂は、0.5 μ Mでウシ胎児血清添加によるRSMCの増殖を有意に阻害する。この増殖阻害は、LNO₂がp27^{kip1} (サイクリン依存性キナーゼインヒビター)を増加させる結果、G₁相の細胞が増加し、S相の細胞が減少することによるものである。LNO₂はKeap1 (Kelch-like ECH-associating protein 1) に作用してNrf2を活性化し、ARE (antioxidant response element) を活性化すると同時にNrf2タンパク質自身も誘導した。また、Nrf2を過剰発現すると、p27^{kip1}が増加した。以上のことから、LNO₂はKeap1/Nrf2経路によりp27^{kip1}を増加させ、血管平滑筋細胞の増殖を停止させることがわかった²⁷⁾。

4-2-5. 腎臓細胞

上記のNrf2はPhase II酵素を誘導したり、酸化ストレスに対応したりするが、その誘導や対応はCysを多く含むセンサーであるKeap1で調節される。Keap1は、Nrf2のcullin 3依存性ユビキチン化と分解を調節する。アルキル化剤のIAB (N-ヨードアセチル-N-ビオチニルヘキシレンジアミン) をHEK293細胞 (human embryonic kidney 293 cells) に作用させると、IABがKeap1のCysに結合する結果、Keap1がポリユビキチン化され、Nrf2の核内蓄積とHO-1誘導が生じた²⁸⁾。一方、同じアルキル化剤でも0.25 μ MのOA-NO₂をHEK-293T細胞に作用させると、Keap1の6つのCysが修飾されるが、中でもCys273とCys288とがOA-NO₂に対して反応性が高かった。OA-NO₂は、このようなCysの修飾によりNrf2を活性化する。Keap1のCysに対する反応性は9-ニトロ-OAの方が10-ニトロ-OAよりも高い。通常、Keap1のCys151が修飾されることが多いが、OA-NO₂はCys151には無関係であった²⁹⁾。

4-2-6. 脂肪細胞

LNO₂やOA-NO₂はPPAR γ を活性化することで3T3-L1前脂肪細胞の分化を誘導し、また分化した脂肪細胞のグルコース取り込みも誘導した。OA-NO₂はPPAR α , γ , δ のすべてを活性化できるが、特にPPAR γ を100 nMの濃度で活性化できるので、親和性だけから見ると本来のPPAR γ に対する生理的リガンドといえるほどで

ある。一方、PPAR α と δ の活性化には300 nMのOA-NO₂が必要であるが、それでもOA-NO₂はかなり強力な活性化剤である¹⁷⁾³⁰⁾。

4-3. 組織および動物実験における作用

4-3-1. 心臓と血管

LNO₂やOA-NO₂のCysへの付加は可逆的であり、MEでタンパク質に付加したものを置換してMEに移すことができ、この量をMS/MSで測定できる。ラット心臓のI/R(虚血・再灌流)を行うと、ミトコンドリアのLNO₂量は3.6から186 pg/mg proteinに増加した³¹⁾。この増加したLNO₂濃度は574 fmol/mg proteinである。ラット灌流心臓を用いてIPC(ischemic preconditioning)を行うと、心臓のミトコンドリアにはLNO₂が620 fmol/mg proteinに増加した。これは大体1 μ Mに相当する。心筋細胞をI/R処理するときに0.5 μ MのLNO₂を添加すると生存率が上昇した。LNO₂はミトコンドリアの脱共役を促進するが、この促進はUCP(uncoupling protein)やANT(adenine nucleotide translocase)阻害剤で阻害された。また、ビオチン化LNO₂はANTのSH基に結合した。適度な脱共役は、心筋保護に働くことがわかっている³²⁾。

マウス心臓の左冠動脈をI/R(30分虚血、30分再灌流)すると、Sham群や虚血のみの群では0であった心臓のOA-NO₂濃度は9.5 nMに上昇した。虚血15分前にOA-NO₂(20 nmol/g 体重)をマウスの腹腔内に投与すると、I/R後の心臓のOA-NO₂濃度は230 nMに増加した。マウス心臓をI/R(30分虚血後24時間再灌流)した場合、OA-NO₂投与により梗塞部位の面積が有意に低下し、左室の機能も改善された。このOA-NO₂の効果は、一部NF- κ Bを介する機序による。前にも述べたように、OA-NO₂処理によってp65にマイケル付加が起き、NF- κ B p65の活性化が有意に低下した。すなわち、この低下はNF- κ Bのシグナルを阻害するためである。OA-NO₂を投与したマウスの心臓では、NF- κ Bの下流に位置するICAM-1(intercellular adhesion molecule 1)やMCP-1の発現が有意に低下し、好中球の浸潤も有意に低下した。また、血清中のTNF α やIL-6のレベルも有意に低下し、虚血部位のアポトーシス細胞数やcaspase-3活性も有意に低下した³³⁾。

マウスの大腿静脈をワイヤで物理的に障害した後、21日間OA-NO₂(2 mg/kg per day)を投与すると、非投与群と比べ内膜の過形成が有意に阻害され、同時にHO-1が誘導された³⁴⁾。この効果はHO-1をSn(IV)-ポリフィリンで阻害した場合やHO-1ノックアウトマウスではみられないので、この効果はHO-1の活性を

介するものである³⁴⁾。

4-3-2. 腎臓

マウス腎臓をI/R(30分虚血、24時間再灌流)すると、血漿中のBUN、クレアチニン、TNF- α などのレベルや組織学的観察で評価した障害度、多形核白血球の浸潤、腎臓でのICAM-1、IL-1 β 、NADPH oxidaseのサブユニットp47^{phox}、gp91^{phox}のmRNAなどのレベルは増加した³⁵⁾。一方、OA-NO₂(500 μ g/kg)を腹腔内に虚血1時間後から6時間ごとに投与すると、これらの増加のすべてが有意に抑制された³⁵⁾。

4-3-3. メタボリックシンドローム

糖尿病性Lep^{ob}(ob/ob)マウスにPPAR γ を活性化するOA-NO₂(8 mg/kg/day)を4週間投与すると、血漿OA-NO₂は32 nMに上昇し、血糖値も正常化し、インスリンレベルも有意に低下し、インスリン抵抗性も改善した。この糖尿病性マウスの体重はRosi(ロシグリタゾン)(6 mg/kg/day)投与で増加したが、OA-NO₂投与では増加しなかった。RosiとOA-NO₂では遺伝子発現のパターンに差があり、例えばRosiはメタボリックシンドロームを進展させるaP2(adipocyte fatty acid binding protein)³⁶⁾を誘導するが、OA-NO₂はその誘導を行わないので、OA-NO₂は副作用が少ないと結論付けられている¹⁸⁾。

動脈硬化モデル動物のアポリポタンパク質E欠損マウスに12週間高脂肪・高コレステロール食を与えた。このマウスにOA-NO₂(8 mg/kg/day)、OA(8 mg/kg/day)、あるいはvehicleを投与し、それらの効果を比較した結果、OA-NO₂投与により大動脈の動脈硬化巣の面積はOAやvehicle投与群に比べ32%低下し、プラークも39%低下した。OA-NO₂は単球/マクロファージの浸潤、MCP-1、VCAM-1、ICAM-1などの発現、O₂⁻発生なども低下させた。これらのマウスのBMDMs(bone marrow-derived macrophages)をLPS処理したとき、OA-NO₂投与マウスから得られた細胞ではO₂⁻発生が少なかった。BMDMsを酸化LDL(low-density lipoprotein)で処理するとSTAT-1が活性化される。この活性化は泡沫細胞生成に関与するが、OA-NO₂によりSTAT-1のリン酸化は低下した。また、OA-NO₂投与マウスのプラークではSTAT-1のリン酸化は低下し、泡沫細胞の生成も抑制された。さらに、OA-NO₂投与によりプラークのコラーゲンや α -SMA(α -smooth muscle actin)の含量が高くなるので、プラークの安定性も高いと考えられた³⁷⁾。

5. その他のニトロアルケン

その他のニトロアルケンとして、コレステリルニトロリノール酸エステル (Ch18:2NO₂) がヒト血漿に約 77 nM 存在するとされている³⁸⁾が、その生理的意義は不明である。

もう一つはニトロ化共役リノール酸 (NO₂-CLA) である。ラット肝臓ミトコンドリアと NO₂⁻を反応させると、9-NO₂-CLA と 12-NO₂-CLA が生成され、CLA は他の脂肪酸よりも量は少ないにもかかわらず優先的にニトロ化された³⁹⁾。

(9Z,11E)-CLA 存在下、RAW 264.7 細胞を LPS/ インターフェロン γ で活性化すると、9-NO₂-CLA と 12-NO₂-CLA が生成した。1 μ M のリノール酸 (LA) や OA を添加しても CLA のほうが高反応性であるために LA や OA はニトロ化されない。(9Z,11E)-CLA をミエロペルオキシダーゼ/H₂O₂/NO₂⁻で酸化すると、9-および 12-NO₂-CLA が生成した。この反応系に CLA の 50 ~ 400 モル倍のチロシンを加えても阻害せず、むしろニトロ化は増加した³⁹⁾。また、LA に ONOO⁻ (<20 μ M) を加えてもニトロ化しないが、(9Z,11E)-CLA の場合には用量依存的なニトロ化がみられた。NO₂ ガスで直接反応性を比較すると、CLA は LA の 10 万倍の反応性を示した。血漿中では共役ジエンはビスアリル基の 1/100 程度しか存在しないが反応性が高いので、CLA が主に NO₂ と反応すると考えられる³⁹⁾。

健康なヒトの血漿中の NO₂-CLA 濃度は平均 0.72 nM であった。ラットに CLA と Na¹⁵NO₂ を各 100 μ mol 投与すると、¹⁵NO₂-CLA は胃、小腸、大腸、血漿、肝臓、尿などに検出される。また、HO-1 タンパク質が大腸上皮細胞の細胞質に誘導された。RAW 264.7 細胞でも 5 μ M の NO₂-CLA の添加により NO₂-LA と同様に HO-1 が誘導された³⁹⁾。ヒト血漿で NO₂-CLA が OA-NO₂ よりもはるかに生成しやすいとしても、NO₂-CLA が有意な生理作用を有しているかどうかは今後の課題である。

6. おわりに

高度不飽和脂肪酸、特にイコサペンタエン酸やドコサヘキサエン酸など n-3 系脂肪酸から生理的に合成されるレゾルビンやプロテクチンなどには特異的受容体が存在し、それを介してニトロアルケンよりはるかに低濃度で消炎作用を示す⁴⁰⁾。一方、炎症部位に存在する活性酸素や窒素酸化物の関与で非酵素的に生成するニトロアルケンは、マイケル付加によっていくつかのタンパク質の機能を変えることで抗炎症作用をもつ。

酸化ストレスセンサータンパク質が高い求核性を持つ Cys を含むことは多くの例で知られているので、コンセプトとしては非常に興味深い。

ニトロアルケンの生体内の濃度は局所でも 1 μ M 程度であろうが、PPAR γ の活性化のように 100 nM でも有効な例があり、1 μ M でもニトロアルケンは多くの機能を発揮することが報告されている。一方、例えばニトロアルケンが NF- κ B を阻害すると、抗酸化系酵素の誘導も同時に阻害することになる。実際に抗炎症剤としてニトロアルケンが *in vivo* で全体的にどの程度の有効性があるのかについて、またニトロアルケンの創薬につながる可能性や毒性など含め、これらの今後の研究の発展が期待される。

(平成 2 ◆ ◆ ◆ 受付)

Key Words : nitrolinoleic acid, nitrooleic acid, nitroalkene, PPAR γ , NF- κ B

The Open University of Japan

Shosuke Kojo

放送大学

小城 勝相

文 献

- 1) Baker PRS, Schopfer FJ, Sweeney S, Freeman BA (2004) Red cell membrane and plasma linoleic acid nitration products: Synthesis, clinical identification, and quantitation. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 11577-11582
- 2) Baker PRS, Lin Y, Schopfer FJ, Woddcock SR, Groeger AL, Bathyany C, Sweeney S, Long MH, Iles KE, Baker LMS, Branchaud BP, Chen YE, Freeman BA (2005) Fatty acid transduction of nitric oxide signaling. Multiple nitrated unsaturated fatty acid derivatives exist in human blood and urine and serve as endogenous peroxisome proliferator-activated receptor ligands. *J Biol Chem* **280**, 42464-42475
- 3) Freeman BA, Baker PS, Schopfer FJ, Woodcock SR, Napolitano A, d'Ischia M (2008) Nitro-fatty acid formation and signaling. *J Biol Chem* **283**, 15515-15519
- 4) Baker PRS, Schopfer FJ, Sweeney S, Freeman BA (2004) Red cell membrane and plasma linoleic acid nitration products: Synthesis, clinical identification, and quantitation. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 11577-11582
- 5) D. Tsikas, A.A. Zoerner, A. Mitschke, F. Gutzki (2009) Nitro-fatty acids occur in human plasma in the picomolar range: a targeted nitro-lipidomics GC-MS/MS study. *Lipids* **44**, 855-865
- 6) Baker PRS, Schopfer FJ, O' Donnell, Freeman BA (2009) Con-

- vergence of nitric oxide and lipid signaling: Anti-inflammatory nitro-fatty acids. *Free Radic Biol Med* **46**, 989-1003
- 7) Rudolph V, Schopfer FJ, Khoo NKH, Rudolph TK, Cole MP, Woodcock SR, Bonacci G, Groeger AL, Golin-Bisello F, Chen C, Baker PRS, Freeman BA (2009) Nitro-fatty acid metabolome: Saturation, desaturation, β -oxidation, and protein adduction. *J Biol Chem* **284**, 1461-1473
 - 8) Schopfer FJ, Baker PRS, Giles G, Chumley P, Batthyany C, Crawford J, Patel RP, Hogg N, Branchaud BP, Lancaster, Jr JR, Freeman BA (2005) Fatty acid transduction of nitric oxide signaling. Nitrolinoleic acid is a hydrophobically stabilized nitric oxide donor. *J Biol Chem* **280**, 19289-19297
 - 9) Uchida K, Stadtman ER (1992) Modification of histidine residues in proteins by reaction with 4-hydroxynonenal. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 4544-4548
 - 10) Uchida K, Stadtman ER (1993) Covalent attachment of 4-hydroxynonenal to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. A possible involvement of intra- and intermolecular cross-linking reaction. *J Biol Chem* **268**, 6388-6393
 - 11) Crabb JW, O'Neil J, Miyagi M, West K, Hoff HF (2002) Hydroxynonenal inactivates cathepsin B by forming Michael adducts with active site residues. *Protein Sci* **11**, 831-840
 - 12) Batthyany C, Schopfer FJ, Baker PRS, Duran R, Baker LMS, Huang Y, Cervenansky C, Branchaud BP, Freeman BA (2006) Reversible post-translational modification of proteins by nitrated fatty acids in vivo. *J Biol Chem* **281**, 20450-20463
 - 13) Baker LMS, Baker PRS, Golin-Bisello F, Schopfer FJ, Fink M, Woodcock SR, Branchaud BP, Radi R, Freeman BA (2007) Nitro-fatty acid reaction with glutathione and cysteine. Kinetic analysis of thiol alkylation by a Michael addition reaction. *J Biol Chem* **282**, 31085-31093
 - 14) Kelley EE, Batthyany CI, Hundley NJ, Woodcock SR, Bonacci G, Del Rio JM, Schopfer FJ, Lancaster Jr JR, Freeman BA, Tarpey MM (2008) Nitro-oleic acid, a novel and irreversible inhibitor of xanthine oxidoreductase. *J Biol Chem* **283**, 36175-36184
 - 15) Coles B, Bloodsworth A, Eiserich JP, Coffey MJ, McLoughlin RM, Giddings JC, Lewis MJ, Haslam RJ, Freeman BA, O'Donnell VB (2002) Nitrolinoleate inhibits platelet activation by attenuating calcium mobilization and inducing phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein through elevation of cAMP. *J Biol Chem* **277**, 5832-5840
 - 16) Coles B, Bloodsworth A, Clark SR, Lewis MJ, Cross AR, Freeman BA, O'Donnell VB (2002) Nitrolinoleate inhibits superoxide generation, degranulation, and integrin expression by human neutrophils. Novel anti-inflammatory properties of nitric oxide-derived reactive species in vascular cells. *Circ Res* **91**, 375-381
 - 17) Schopfer FJ, Lin Y, Baker PRS, Cui T, Garcia-Barrio M, Zhang J, Chen K, Chen YE, Freeman BA (2005) Nitrolinoleic acid: An endogenous peroxisome proliferator-activated receptor γ ligand. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 2320-2345
 - 18) Schopfer FJ, Cole MP, Groeger AL, Chen C, Khoo NKH, Woodcock SR, Golin-Bisello F, Motanya UN, Li Y, Zhang J, Garcia-Barrio MT, Rudolph TK, Bonacci G, Baker PRS, Xu HE, Batthyany CI, Chen YE, Hallis TM, Freeman BA (2010) Covalent peroxisome proliferator-activated receptor γ adduction by nitro-fatty acids. Selective ligand activity and anti-diabetic signaling actions. *J Biol Chem* **285**, 12321-12333
 - 19) Li Y, Zhang J, Schopfer FJ, Martynowski D, Garcia-Barrio MT, Kovach A, Suino-Powell K, Baker PRS, Freeman BA, Chen YE, Xu HE, (2008) Molecular recognition of nitrated fatty acids by PPAR. *Nat Struct Mol Biol* **15**, 865-867
 - 20) Cui T, Schopfer FJ, Zhang J, Chen K, Ichikawa T, Baker PRS, Batthyany C, Chacko BK, Feng X, Petel RP, Agarwal A, Freeman BA, Chen YE (2006) Nitrated fatty acids: Endogenous anti-inflammatory signaling mediators. *J Biol Chem* **281**, 35686-35698
 - 21) Straus DS, Pascual G, Li M, Welch JS, Ricote M, Hsiang C, Sengchuthalangsy LL, Ghosh G, Glass CK (2000) 5-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J_2 inhibits multiple steps in the NF- κ B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 4844-4849
 - 22) Ichikawa T, Zhang J, Chen K, Liu Y, Schopfer FJ, Baker PRS, Freeman BA, Chen YE, Cui T (2008) Nitroalkenes suppress lipopolysaccharide-induced signal transducer and activator of transcription signaling in macrophages: A critical role of mitogen-activated protein kinase phosphatase 1. *Endocrinol* **149**, 4086-4094
 - 23) Kansanen E, Jyrkkanen HK, Volger OL, Leinonen H, Kivela AM, Hakkinen SK, Woodcock SR, Schopfer FJ, Horrevoets AJ, Yla-Herttuala S, Freeman BA, Levonen AL (2009) Nrf2-dependent and -independent responses to nitro-fatty acids in human endothelial cells. Identification of heat shock response as the major pathway activated by nitro-oleic acid. *J Biol Chem* **284**, 33233-33241
 - 24) Wright MM, Schopfer FJ, Baker PRS, Vidyasagar V, Powell P, Chumley P, Iles KE, Freeman BA, Agarwal A (2006) Fatty acid transduction of nitric acid signaling: Nitrolinoleic acid potently activated endothelial heme oxygenase 1 expression. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 4299-4304
 - 25) Wright MM, Kim J, Hock TD, Leitingner N, Freeman BA, Agarwal A (2009) Human haem oxygenase-1 induction by nitro-linoleic acid is mediated by camp, AP-1 and E-box response element interactions. *Biochem J* **422**, 353-361
 - 26) Lim DG, Sweeney S, Bloodsworth A, White CB, Chumley PH, Krishna NR, Schopfer F, O'Donnell VB, Eiserich JP, Freeman BA (2002) Nitrolinoleate, a nitric oxide-derived mediator of cell function: Synthesis, characterization, and vasomotor activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 15941-15946
 - 27) Villacorta L, Zhang J, Garcia-Barrio MT, Chen X, Freeman BA, Chen YE, Cui T (2007) Nitro-linoleic acid inhibits vascular smooth muscle cell proliferation via the Keap 1/Nrf2 signaling pathway. *Am J Physiol* **293**, H770-H776
 - 28) Hong F, Sekhar KR, Freeman ML, Liebler DC (2005) Specific patterns of electrophile adduction trigger Keap1 ubiquitination and Nrf2 activation. *J Biol Chem* **280**, 31768-31775
 - 29) Kansanen E, Bonacci G, Schopfer FJ, Kuosmanen SM, Tong KI,

- Leinonen H, Woodcock SR, Yamamoto M, Carlberg C, Yla-Herttuala S, Freeman BA, Levenon A (2011) Electrophilic nitro-fatty acids activate NRF2 by a KEAP1 cysteine 151-independent mechanism. *J Biol Chem* **286**, 14019-14027
- 30) Baker PRS, Lin Y, Schopfer FJ, Woodcock SR, Groeger AL, Batthyany C, Sweeney S, Long MH, Iles KE, Baker LMS, Branchaud BP, Chen YE, Freeman BA (2005) Fatty acid transduction of nitric oxide signaling. Multiple nitrated unsaturated fatty acid derivatives exist in human blood and urine and serve as endogenous peroxisome proliferator-activated receptor ligands. *J Biol Chem* **280**, 42464-42475
- 31) Schopfer FJ, Batthyany C, Baker PRS, Bonacci G, Cole MP, Rudolph V, Groeger AL, Rudolph TK, Nadtochiy S, Brookes PS, Freeman BA (2009) Detection and quantification of protein adduction by electrophilic fatty acids: mitochondrial generation of fatty acid nitroalkene derivatives. *Free Radic Biol Med* **46**, 1250-1259
- 32) Nadtochiy SM, Baker PRS, Freeman BA, Brookes PS (2009) Mitochondrial nitroalkene formation and mild uncoupling in ischemic preconditioning: implications for cardioprotection. *Cardiovasc Res* **82**, 333-340
- 33) Rudolph V, Rudolph TK, Schopfer FJ, Bonacci G, Woodcock SR, Cole MP, Baker PRS, Ramani R, Freeman BA (2010) Endogenous generation and protective effects of nitro-fatty acids in a murine model of focal cardiac ischaemia and reperfusion. *Cardiovasc Res* **85**, 155-166
- 34) Cole MP, Rudolph TK, Khoo NKH, Motanya UN, Golin-Bisello F, Werts JW, Schopfer FJ, Rudolph V, Woodcock SR, Bolisetty S, Ali MS, Zhang J, Chen YE, Agarwal A, Freeman BA, Bauer PM (2009) Nitro-fatty acid inhibition of neointima formation after endoluminal vessel injury. *Circ Res* **105**, 965-972
- 35) Liu H, Jia Z, Soodvilai S, Guan G, Wang M, Dong Z, Symons JD, Yang T (2008) Nitro-oleic acid protects the mouse kidney from ischemia and reperfusion injury. *Am J Physiol* **295**, F942-F949
- 36) Kralisch S, Fasshauer (2013) Adipocyte fatty acid binding protein: a novel adipokine involved in the pathogenesis of metabolic and vascular disease? *Diabetologia* **56**, 10-21
- 37) Rudolph TK, Rudolph V, Edreira MM, Cole MP, Bonacci G, Schopfer FJ, Woodcock SR, Franek A, Pekarova M, Khoo NKH, Hasty AH, Baldus S, Freeman BA (2010) Nitro-fatty acids reduce atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**, 938-945
- 38) Lima ES, Mascio PD, Abdalla DSP (2003) Cholesteryl nitrooleate, a nitrated lipid present in human blood plasma and lipoproteins. *J Lipid Res* **44**, 1660-1666
- 39) Bonacci G, Baker PRS, Salvatore SR, Shores D, Khoo NKH, Koenitzer JR, Vitturi DA, Woodcock SR, Golin-Bisello F, Cole MP, Watkins S, St. Croix C, Batthyany CI, Freeman BA, Schopfer FJ (2012) Conjugated linoleic acid is a preferential substrate for fatty acid nitration. *J Biol Chem* **287**, 44071-44082
- 40) Serhan CN, Petasis NA (2011) Resolvins and Protectins in inflammation-resolution. *Chem Rev* **111**, 5922-5943